

#9

Docket No. 203975US0X

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Bettina MOECKEL et al

SERIAL NO: New U.S. Application

FILED: Herewith

FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR THE luxR GENE

1017 U.S. PTO  
09/903771  
07/13/01

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS  
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
GERMANY	100 39 043.9	AUGUST 10, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ is submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and  
(B) Application Serial No.(s)
  - ☐ are submitted herewith
  - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Registration No. 24,618

Daniel J. Pereira, Ph.D.  
Registration No. 45,518



22850

Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 10/98)



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 39 043.9

**Anmeldetag:** 10. August 2000

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,  
Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Neue für das luxR-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

**IPC:** C 07 H, C 12 P, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 13. Juni 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Faust

### Neue für das luxR-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das luxR-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, durch Abschwächung des luxR-Gens.  
5 Das luxR-Gen kodiert für das LuxR-Protein, welches ein Transkriptionsaktivator ist.

#### Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.  
10

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst  
15 20 25 betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren.  
30

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure-produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt.

## 5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

## Beschreibung der Erfindung

10 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das luxR-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

15 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No.  
20 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz  
25 von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsaktivators LuxR aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine  
30 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1 oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind:

- 10 eine replizierbare DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

- 15 ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, Punkt d, insbesondere pCR2.1luxRint, hinterlegt in Escherichia coli DSM 13619 bei der DSMZ, Braunschweig (Deutschland);

- 20 und coryneforme Bakterien, die in dem luxR-Gen eine Insertion oder Deletion, insbesondere unter Verwendung des Vektors pCR2.1luxRint, enthalten.

- Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung
- 25 einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthält mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als Hybridisierungs sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für das LuxR-Protein  
5 kodieren oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des luxR-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann,  
10 die für das LuxR-Protein kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende  
15 Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf  
20 Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene  
25 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des LuxR-Proteins und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und  
30 besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen  
5 die für das luxR-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der  
10 intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer  
15 niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren, insbesondere L-Lysin  
20 aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art  
25 Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), sind  
30 besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032  
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806  
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870  
Corynebacterium melassecola ATCC17965

*Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539  
*Brevibacterium flavum* ATCC14067  
*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und  
*Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

- 5 oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende  
Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise die L-  
Lysin produzierenden Stämme

- Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709  
*Brevibacterium flavum* FERM-P 1708  
10 *Brevibacterium lactofermentum* FERM-P 1712  
*Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6463  
*Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6464  
*Corynebacterium glutamicum* DM58-1  
*Corynebacterium glutamicum* DG52-5  
15 *Corynebacterium glutamicum* DSM 5714 und  
*Corynebacterium glutamicum* DSM 12866

Den Erfindern gelang es, das neue, für das LuxR-Protein  
kodierende luxR-Gen von *C. glutamicum*, welches ein  
Transkriptionsaktivator ist, zu isolieren.

- 20 Zur Isolierung des luxR-Gens oder auch anderer Gene von *C.*  
*glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses  
Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt.  
Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten  
Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als  
25 Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone,  
Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie,  
Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von  
Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual  
(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine  
30 sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes  
W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  
 $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and  
General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine  
Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des



Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Börmann et al.

- 5 (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pH79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 11, 291-298).

- 10 Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm
- 15 DH5 $\alpha$  (Jeffrey H. Miller: „A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992).

- 20 Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen  $\lambda$ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert werden.

- Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei
- 25 Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben.

- Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von
- 30 Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das luxR-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben  
5 beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des luxR-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch  
10 die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative  
15 Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist  
20 bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene  
25 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind  
30 ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben  
35 typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH  
5 (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait:  
10 Oligonukleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach  
15 Abschwächung des luxR-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des luxR-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder  
20 ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen.  
25 Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy  
30 (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999))  
35 und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und

Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 5 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological 10 Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des 15 Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen 20 werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen (missense 25 mutations) oder Nichtsinnmutationen (nonsense mutations) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen (frame shift mutations), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die 30 Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und 35 Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers

(„Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav  
5 Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung (gene disruption) und des Gen-Austauschs (gene  
10 replacement).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann.  
15 Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI,  
20 USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology  
25 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al.  
30 (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS  
35 Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.

Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von *C. glutamicum* verwendet.

In Figur 1 ist beispielhaft der Plasmidvektor pCR2.1luxRint gezeigt, mit Hilfe dessen das luxR-Gen unterbrochen bzw. ausgeschaltet werden kann.

Bei der Methode des Genaustausches (gene replacement) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für *C. glutamicum* nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das pyc-Gen von *C. glutamicum* durch eine Deletion auszuschalten.

In das luxR-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des luxR-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Pentosephosphat-Zyklus oder des

Aminosäure-Exports zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

5 So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Enolase kodierende Gen eno (DE: 19947791.4),
- 10 • das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998))
- 15 • das für den Lysin-Export kodierende Gen lyse (DE-A-195 48 222)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

20 Außerdem kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des luxR-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
- 25 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE:1995 1975.7, DSM 13114)

abzuschwächen.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des luxR-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products, 5 Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können 10 kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über 15 bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, 20 Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der 25 American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl 30 und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.



Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff- haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat.

Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel  
5 so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed  
10 phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Folgender Mikroorganismus wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli Stamm TOP10F/pCR2.1luxRint als DSM  
15 13619.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

- 20 Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA)  
25 durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

30 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *C. glutamicum* ATCC 13032

- Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben,
- 5 isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland,
- 10 Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
- 15 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.
- 20 Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der
- 25 behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing
- 30 Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

- Zur Infektion des *E. coli* Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der
- 35 Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor)  
beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar  
(Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin  
ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C  
5 wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

### Beispiel 2

#### Isolierung und Sequenzierung des Gens luxR

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep  
Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden,  
10 Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem  
Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg,  
Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-  
0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit  
shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular  
15 Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung  
SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach  
gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung  
der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp  
mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021,  
20 Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma  
Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung  
Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde  
mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia,  
25 Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product  
No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der  
Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie  
von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory  
Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei  
30 das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg,  
Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses  
Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm  
DH5αMCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy  
of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et

al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 µg/ml Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 639 bp, welches als luxR-Gen bezeichnet wurde. Das luxR-Gen kodiert für ein Polypeptid von 212 Aminosäuren.

Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsvektors für die Integrationsmutagenese des luxR-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum* bekannten Sequenz des luxR-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion ausgewählt:

10 luxRintA:  
5`GGA ATC GAC GTC ATC TTG AT 3`  
luxRintB:  
5`GCA ACC AGC TTG AGA ACT TC 3`

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press) mit Pwo-Polymerase der Firma Boehringer die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde ein 353 bp großes internes Fragment des luxR-Gens isoliert, welches in der SEQ ID No. 3 dargestellt ist.

Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991), Bio/Technology 9:657-663) ligiert.

Anschließend wurde der *E. coli* Stamm TOP10F mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA cloning. A Practical Approach. Vol. I, IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.,

- 1989), der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und
- 5 anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCR2.1luxRint genannt.

#### Beispiel 4

Integrationsmutagenese des luxR-Gens in dem Lysinproduzenten DSM 5715

- 10 Der in Beispiel 3 genannte Vektor pCR2.1luxRint wurde nach der Elektroporationsmethode von Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in C. glutamicum DSM 5715 elektroporiert. Bei dem Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten Lysin-Produzenten.
- 15 Der Vektor pCR2.1luxRint kann in DSM 5715 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom von DSM 5715 integriert hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromosom integriertem pCR2.1luxRint erfolgte durch Ausplattieren des
- 20 Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.

- Für den Nachweis der Integration wurde das luxRint-Fragment
- 25 nach der Methode "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert. Chromosomale DNA eines potentiellen Integranten wurde nach
- 30 der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den Restriktionsenzymen SalI, SacI und HindIII geschnitten. Die entstehenden Fragmente wurden mit Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybridisierungskit

der Firma Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in  
Beispiel 3 genannte Plasmid pCR2.1luxRint hatte innerhalb  
des chromosomalen luxR-Gens ins Chromosom von DSM 5715  
inseriert. Der Stamm wurde als DSM 5715::pCR2.1luxRint  
5 bezeichnet.

### Beispiel 5

#### Herstellung von L-Lysin

Der in Beispiel 4 erhaltene *C. glutamicum* Stamm DSM  
5715::pCR2.1luxRint wurde in einem zur Produktion von L-  
10 Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der L-  
Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem  
entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin  
(25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von  
15 dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10  
ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die  
Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

#### Medium Cg III

NaCl	2,5 g/l
Bacto-Pepton	10 g/l
Bacto-Yeast-Extrakt	10 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4  
eingestellt

Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur  
20 wurde 24 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler  
inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur  
angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur



0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet

## Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor)	5 g/l
MOPS	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50g/l
Salze:	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g/l
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g/l
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
CaCO <sub>3</sub>	25 g/l

5 CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH. 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen sowie das trocken autoklavierte CaCO<sub>3</sub> zugesetzt.

10 Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchtigkeit.

Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete L-Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik  
5 (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustausch-Chromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD(660)	Lysin-HCl g/l
DSM 5715	7,5	13,01
DSM 5715::pCR2.1luxRint	8,8	15,41

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa-Hüls AG

5 &lt;120&gt; Neue für das luxR-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 000177 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1052

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (214)..(849)

&lt;223&gt; luxR-Gen

25

&lt;400&gt; 1

tgcagcattg ccggtggagc caccagaggg gtttgtcggg gcgccggttt tggcagattc 60

ggactcaagt gctacaggcg aggttgaact aagttctcca actgacgatg agtaaggcta 120

30

gactaaagta cgattcatct gctcatcgat actcttgaag gcgcattttc attcgaaacg 180

aagtgcgcca ttgggaagga cctagttcaa aca atg att cgc gtg ctg ctt gct 234

Met Ile Arg Val Leu Leu Ala

1

5

35

gat gac cac gaa atc gtg agg ctc gga ctc cga gct gtg ctg gaa agc 282

Asp Asp His Glu Ile Val Arg Leu Gly Leu Arg Ala Val Leu Glu Ser

10

15

20

40

gcc gag gac att gaa gtg gtg ggc gaa gtc tcc acc gcc gaa ggt gcg 330

Ala Glu Asp Ile Glu Val Val Gly Glu Val Ser Thr Ala Glu Gly Ala

25

30

35

45

gtg cag gca gcc caa gaa ggc gga atc gac gtc atc ttg atg gac ctc 378

Val Gln Ala Ala Gln Glu Gly Gly Ile Asp Val Ile Leu Met Asp Leu

40

45

50

55

50

cga ttc ggc ccc ggc gtc caa gga acc cag gtt tcc aca ggc gca gac 426

Arg Phe Gly Pro Gly Val Gln Gly Thr Gln Val Ser Thr Gly Ala Asp

60

65

70

55

gcc acc gca gcc atc aag cga aac atc gat aac ccg cca aaa gtc ctg 474

Ala Thr Ala Ala Ile Lys Arg Asn Ile Asp Asn Pro Pro Lys Val Leu

75

80

85

gtc gtg acc aac tac gac acc gac aca gac atc ctc ggc gca atc gaa 522

Val Val Thr Asn Tyr Asp Thr Asp Thr Asp Ile Leu Gly Ala Ile Glu

90

95

100

gcc ggc gca ctg ggc tac ctg ctc aaa gac gcc cca ccg agc gaa ctc 570  
 Ala Gly Ala Leu Gly Tyr Leu Leu Lys Asp Ala Pro Pro Ser Glu Leu  
 105 110 115

5 ctg gca gca gta cga tcc gca gca gaa ggt gac tcc aca ctg tca ccc 618  
 Leu Ala Ala Val Arg Ser Ala Ala Glu Gly Asp Ser Thr Leu Ser Pro  
 120 125 130 135

10 atg gtt gcg aac cgc ctg atg act cgc gtg cgc acc ccc aaa acc tca 666  
 Met Val Ala Asn Arg Leu Met Thr Arg Val Arg Thr Pro Lys Thr Ser  
 140 145 150

15 ctc acc cca cgt gaa ctg gaa gtt ctc aag ctg gtt gcc ggt gga tcc 714  
 Leu Thr Pro Arg Glu Leu Glu Val Leu Lys Leu Val Ala Gly Gly Ser  
 155 160 165

20 tcc aac cgc gac att ggc cgt atc ctc ttc ctc tca gaa gcc acg gtg 762  
 Ser Asn Arg Asp Ile Gly Arg Ile Leu Phe Leu Ser Glu Ala Thr Val  
 170 175 180

25 aaa tcc cac ctc gtg cac atc tac gac aag ctc ggc gtg cgg tca cgt 810  
 Lys Ser His Leu Val His Ile Tyr Asp Lys Leu Gly Val Arg Ser Arg  
 185 190 195

acc tcc gct gtc gca gcc gca cgt gag cag ggg ctg ctg tagcgggggt 859  
 Thr Ser Ala Val Ala Ala Ala Arg Glu Gln Gly Leu Leu  
 200 205 210

30 tgctgcaagg ctttaggtat ccgcgccggg gttggcctac gggagcatcc cgaggcttta 919  
 gcagggggcac gggctctggc ttgggctgag tcagggggcgc ggccaatgct ttccgacgcg 979  
 tgtctccacg gctttattta gtttttcaag aagtttgacg aaggtgcgta gctcctcttc 1039

35 gggccagtct gaa 1052

40 <210> 2  
 <211> 212  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum

45 <400> 2  
 Met Ile Arg Val Leu Leu Ala Asp Asp His Glu Ile Val Arg Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Ala Val Leu Glu Ser Ala Glu Asp Ile Glu Val Val Gly Glu  
 20 25 30

50 Val Ser Thr Ala Glu Gly Ala Val Gln Ala Ala Gln Glu Gly Gly Ile  
 35 40 45

55 Asp Val Ile Leu Met Asp Leu Arg Phe Gly Pro Gly Val Gln Gly Thr  
 50 55 60

Gln Val Ser Thr Gly Ala Asp Ala Thr Ala Ala Ile Lys Arg Asn Ile  
 65 70 75 80

Asp Asn Pro Pro Lys Val Leu Val Val Thr Asn Tyr Asp Thr Asp Thr  
                             85                            90                            95  
 5 Asp Ile Leu Gly Ala Ile Glu Ala Gly Ala Leu Gly Tyr Leu Leu Lys  
                             100                            105                            110  
 Asp Ala Pro Pro Ser Glu Leu Leu Ala Ala Val Arg Ser Ala Ala Glu  
                             115                            120                            125  
 10 Gly Asp Ser Thr Leu Ser Pro Met Val Ala Asn Arg Leu Met Thr Arg  
                             130                            135                            140  
 Val Arg Thr Pro Lys Thr Ser Leu Thr Pro Arg Glu Leu Glu Val Leu  
                             145                            150                            155                            160  
 15 Lys Leu Val Ala Gly Gly Ser Ser Asn Arg Asp Ile Gly Arg Ile Leu  
                             165                            170                            175  
 Phe Leu Ser Glu Ala Thr Val Lys Ser His Leu Val His Ile Tyr Asp  
                             180                            185                            190  
 20 Lys Leu Gly Val Arg Ser Arg Thr Ser Ala Val Ala Ala Arg Glu  
                             195                            200                            205  
 25 Gln Gly Leu Leu  
                             210  
 30 <210> 3  
       <211> 353  
       <212> DNA  
       <213> Corynebacterium glutamicum  
 35 <220>  
       <223> luxRint  
 <400> 3  
 40 ggaatcgacg tcattctgat ggacctccga ttcgggccccg gcgtccaagg aaccaggtt 60  
       tccacaggcg cagacgccac cgcagccatc aagcgaaaca tcgataacct gccaaaagtc 120  
       ctggtcgtga ccaactacga caccgacaca gacatcctcg gcgcaatcga agccggcgca 180  
       ctgggctacc tgctcaaaga cgccccaccg agcgaactcc tggcagcagt acgatccgca 240  
       gcagaagggtg actccacact gtcacccatg gttgcgaacc gcctgatgac tcgcgtgcgc 300  
       acccccaaaa cctcactcac cccacgtgaa ctggaagttc tcaagctggt tgc 353  
 45

Folgende Figuren sind beigelegt:

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1luxRint.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

KmR:	Kanamycin Resistenz-Gen
EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI
luxRint:	internes Fragment des luxR-Gens
ColE1 ori:	Replikationsursprung des Plasmids ColE1

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das luxR-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
  - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens zu 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
  - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), oder c),wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsaktivators LuxR aufweist.
- 20 2. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 enthaltend
  - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz  
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den  
Sequenzen (i) oder (ii) komplementären  
Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Coryneforme Bakterien, in denen das luxR-Gen  
abgeschwächt, bevorzugt ausgeschaltet wird.
7. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren,  
insbesondere L-Lysin, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man folgende  
Schritte durchführt,
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure  
produzierenden Bakterien, in denen man zumindest  
das luxR-Gen abschwächt,
- b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium  
oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man Bakterien  
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des  
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure  
verstärkt.
9. Verfahren gemäß Anspruch 7, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man Bakterien  
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest  
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der  
gewünschten L-Aminosäure verringern.
10. Verfahren gemäß Anspruch 7, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die Expression  
des (der) Polynukleotids(e), das (die) für das luxR-



Gen kodiert (kodieren) verringert, insbesondere ausschaltet.

11. Verfahren gemäß Anspruch 7, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die  
regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids  
herabsetzt, für das das Polynukleotid luxR kodiert.
12. Verfahren gemäß Anspruch 7, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man für die  
Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin,  
Bakterien fermentiert, in denen man gleichzeitig eines  
oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 12.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase  
kodierende Gen dapA,
- 12.2 das für die Enolase kodierende Gen eno,
- 12.3 das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf,
- 12.4 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen  
pyc,
- 12.5 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,  
verstärkt, bevorzugt überexprimiert.
13. Verfahren gemäß Anspruch 7, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man gleichzeitig  
eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der  
Gruppe:
- 13.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase  
kodierende Gen pck,
- 13.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase  
kodierende Gen pgi,
- 13.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB  
abschwächt.

14. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.
- 5 15. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für den Transkriptionsaktivator LuxR kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des luxR-Gens aufweisen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man die
- 10 Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 als Hybridisierungssonden einsetzt.

**Neue für das luxR-Gen kodierende Nukleotidsequenzen**

## Zusammenfassung

Isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das luxR-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung der Polynukleotidsequenzen als Hybridisierungs-

20 sonden.

Figur 1: Plasmidkarte von pCR2.1luxRint

